

(130) Kinds of the document	C1	
(140) Dates of the publication	1997.04.20	
(190) Countries of the publication		R
(210) Registration numbers of the application		94
(220) Dates of application	1994.12.06	
(460) Dates of the publication of the formula of the invention		19
(516) Numbers of edition МПК	6	
(511) Basic indexes МПК	A61K38/21	
The name	GENETIC-ENGINEERING GAMMA-INTERFERON PREPARATION	
(711) Names of the applicant	Gosudarstvennyj nauchno-issledovatel'skij institut prikladnoj mikrobiologii	
(721) Names of the inventor	Somov A.N.	
(721) Names of the inventor	Cherepanov P.A.	
(721) Names of the inventor	Fedjukin V.S.	
(721) Names of the inventor	Pavlov V.M.	
(721) Names of the inventor	Astashkina G.F.	
(721) Names of the inventor	Shmatchenko N.A.	
(731) Names патентообладателя		

Go

№2077336. Abstract

FIELD: biotechnology, medicine, pharmacy, veterinary science.

SUBSTANCE: invention proposes the preparation based on genetic-engineering gamma-interferon (molecular mass is 16.7 kDa0 consisting of 144 amino acid residues. Preparation is prepared by microbiological synthesis followed by chromatography purification. Specific antiviral activity of preparation is 2×10^7 IU/mg protein (not less) and as nonionogenic surface-active substance contains 0.5-3 % of amino acid arginine, histidine or lysine or its physiologically acceptable salt at amount 0.5-3 %, and nonionogenic surface-active substance. **EFFECT:** high antiviral activity, prolonged stability during storage (at least one year). 5 cl



(19) RU (11) 2077336 (13) C1
(51) 6 A 61 K 38/21

Комитет Российской Федерации
по патентам и товарным знакам

23 июля 1997

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ**
к патенту Российской Федерации

ВСЕРОССИЙСКАЯ
ПАТЕНТНО-ТЕХНИЧЕСКАЯ
БИБЛИОТЕКА

1

(21) 94042742/14 (22) 06.12.94
(46) 20.04.97 Бюл. № 11
(72) Сомов А.Н., Черепанов П.А., Федюкин
В.С., Павлов В.М., Асташкина Г.Ф., Шмат-
ченко Н.А.
(71) (73) Государственный научно-исследо-
вательский институт прикладной микроби-
ологии
(56) Патент ЕПВ N 0196203, кл. А 61К
38/21, 1986.
(54) ПРЕПАРАТ ГЕННОИНЖЕНЕРНОГО
ГАММА-ИНТЕРФЕРОНА
(57) Изобретение относится к биотехноло-
гии, фармации, медицине и ветеринарии и
может быть использовано для профилакти-
ки и лечения вирусных заболеваний, ново-
образований и расстройств иммунитета у
людей и животных. Предлагается препарат
на основе высокоочищенного генно-инже-
нерного гамма-интерферона с мол. м. 16,7
кДа, состоящего из 144 аминокислотных
остатков и полученного микробиологиче-

2

ским синтезом с последующей хроматогра-
фической очисткой. Препарат имеет удель-
ную противовирусную активность не менее
 $2 \cdot 10^7$ МЕ/мг белка и содержит, по данным
ПААГ-ДСН электрофореза, не менее 95%
основного вещества в форме мономера, а в
димерной форме не более 5%. Препарат
имеет в своем составе биологически инерт-
ный низкомолекулярный полимерный на-
полнитель-стабилизатор
(поливинилпирролидон либо декстран) и
солевую буферную систему с pH 4,5 - 7,5;
в состав препарата также может входить
аминокислота аргинин, гистидин или лизин
либо ее физиологически приемлемая соль в
количестве от 0,5 до 3% и неионогенное
поверхностно-активное вещество. Препарат
обладает высокой противовирусной активнос-
тью и хорошей стабильностью (сухой пре-
парат может храниться без потери
активности не менее года). 4 з.п. ф-лы.

dry

RU

2077336

C1

RU

2077336

C1

Изобретение относится к биотехнологии, фармации, медицине и ветеринарии и может быть использовано для получения препарата, предназначенного для профилактики и лечения вирусных заболеваний, новообразований и расстройств иммунитета у людей и животных.

Известно, что иммунный интерферон (гамма-интерферон) отличается нестабильностью в водных растворах, особенно в повышенных концентрациях, что приводит к потере его биологической активности и образованию агрегатов молекул с выпадением осадка [1].

Известен препарат стабилизированного гамма-интерферона [2], для получения которого использовали солевые буферы в области pH 4 - 5 с добавлением человеческого (донорского) сывороточного альбумина в концентрации 1 - 5 мг/мл раствора и последующим сублимационным высушиванием раствора до остаточной влажности 2 - 5%. Однако это приводит к риску заражения вирусами СПИДа и гепатита В, загрязняющими препараты альбумина, и в ряде случаев, особенно при лечении раковых больных большими дозами препарата гамма-интерферона, к быстрой сенсибилизации организма больного к введенному белку и вследствие этого снижению эффективности препарата и даже возникновению аллергических состояний [3].

Для стабилизации водных растворов различных интерферонов использовали аминокислоты аргинин, гистидин, лизин и некоторые другие, а также их соли в количестве от $5 \cdot 10^{-6}$ до $5 \cdot 10^{-3}$ моль/л [4].

Известен также препарат фибробластного интерферона (бета-интерферона), в состав которого наряду с высокоочищенным рекомбинантным бета-интерфероном входят поливинилпирролидон и ацетатно-солевой буфер [5]. Однако использование сильно кислых растворов (pH - 3,5) и менее эффективного фибробластного интерферона, чем лейкоцитарный и иммунный интерфероны ограничивает область медицинского применения полученного препарата.

Задачей изобретения является получение препарата генно-инженерного гамма-интерферона при высокой активности и стабильности, не вызывающего побочных эффектов.

Эта задача решается тем, что предлагается препарат на основе высокоочищенного гамма-интерферона с мол. м. 16,7 кДа, состоящего из 144 аминокислотных остатков, имеющего удельную антивирусную активность не менее $2 \cdot 10^7$ МЕ/мг и содержащего,

по данным электрофореза в полиакриламидном геле с добавлением додецилсульфата натрия, не менее 95% основного вещества в форме мономера, а в димерной форме не более 5%, а также дополнительно имеющего в составе биологически инертный полимерный наполнитель и аминокислоту либо ее соль, поверхностно-активное вещество (ПАВ) и солевую буферную систему с pH 4,5 - 7,5 при следующем соотношении компонентов (в пересчете на одну дозу, мкг):

Высокоочищенный гамма-интерферон	10 - 100
Биологически инертный полимер с мол. м. 10 - 100 тыс. Да	(5 - 70) · 10 ³
Аминокислота либо ее соль	(5 - 30) · 10 ³
ПАВ	(0,2 - 5) · 10 ³

Солевая буферная система	
pH 4 - 7,5	(8 - 12) · 10 ⁴

В качестве стабилизирующих добавок используют биологически инертные полимеры: медицинский поливинилпирролидон с мол. м. от 10000 до 60000 Да в концентрации от 0,5 до 15% или декстран с мол. м. от 10000 до 100000 Да (полиглюкин либо реополиглюкин) в концентрации от 0,5 до 10%. В качестве солюбилизирующих веществ используют аминокислоты аргинин, гистидин, лизин либо их физиологически приемлемые соли - гидрохлорид, сульфат, ацетат, глутамат, аспартат и малеат, в концентрации от 0,1 до 3% по массе; неионогенные поверхностно-активные вещества Tween 20, Tween 60, Tween 80, Span 20, Span 40, Span 60 в концентрации от 0,001 до 0,1 мас. %. Добавки вводят в сухом (концентрированном) виде в состав водно-солевого буфера, в качестве которого можно использовать ацетатный, ацетатно-солевой, фосфатно-солевой, цитратно-солевой и др. буферы на основе физиологически приемлемых солей в диапазоне pH от 4,5 до 7,5 либо жидкий инъекционный препарат "Гемодез" состава, г на 1 л:

Поливинилпирролидон медицинский низкомолекулярный	300
Натрия хлорид	275
Калия хлорид	2,1
Кальция хлорид	2,5
Магния хлорид	0,025
Натрия гидрокарбонат	1,15
Вода дистиллированная	До 1 л

Активным началом предлагаемого препарата является высокоочищенный генно-инженерный гамма-интерферон, полученный с использованием одного из штаммов-проду-

центров (например, E. coli MC-1061/pTTykm2, со следующими характеристиками:

Степень чистоты при ПА-АГ/ДСН-электрофорезе	Более 95%
Молекулярная масса мономера	16,7 кДа
Число аминокислотных остатков	144
Аминокислотный состав генно-инженерного гамма-интерферона:	
MQDPYVKEAENLK KYFNAGHSD	
VADNGTLFLGILKNWKEESDRK	
IMQS	-48
QIVSFYFKLFKNFKDDQSIQKSV	
ETIKEDMNVKFFNSNKKKRDDF	
EKLNT	-98
YSVTDLNVQRKAIHELIVMAEL	
SPAAKTGKRKRSQMLFRGRRAS	
Q	-144

Иммунохимические свойства: реагирует только с антителами к гамма-интерферону; отношение к рН: устойчив в диапазоне рН от 4,5 до 10; удельная антивирусная активность: не менее $2 \cdot 10^7$ МЕ/мг.

Концентрированный раствор гамма-интерферона разводят до терапевтической концентрации (от 10 до 100 мкг/мл) водным буферным раствором, содержащим стабилизирующие добавки. Жидкий полуфабрикат сублимационно высушивают и хранят при температуре не выше $+10^\circ\text{C}$ в течение 1 года.

Полученный препарат нетоксичен, апирогенен при испытаниях на животных, обладает контролируемой антивирусной активностью при испытаниях на культуре человеческих фибробластов, зараженных вирусом везикулярного стоматита (от 50000 МЕ/мл раствора до 1 млн. МЕ/мл раствора), не вызывает побочных реакций у испытуемых животных; препарат быстро, в течение нескольких секунд, растворяется в воде и физиологическом растворе для инъекций, этот раствор остается прозрачным при комнатной температуре не менее чем 48 ч.

Пример 1. Сухой инъекционный препарат гамма-интерферона. Препарат получают путем смешивания концентрированного водного раствора генно-инженерного гамма-интерферона на основе ацетатно-солевого буфера рН 7,0 со стабилизирующим раствором на основе инъекционного жидкого препарата "Гемодез" с конечной концентрацией активного белка 20 мкг/мл (одна терапевтическая доза).

Полученный раствор стерильно фильтруют, разливают в ампулы по 1 мл и замораживают при -40°C . Режим сублимационного высушивания: 2 ч при температуре полки -40°C , затем постепенное повышение

температуры со скоростью $2,5^\circ\text{C}$ в 1 ч и досушивание при $+30^\circ\text{C}$ в течение 6-8 ч до остаточной влажности 3,5%. Полученный сухой инъекционный препарат представляет собой пористую массу (таблетку) кремового цвета, растворяется в воде для инъекций в течение нескольких секунд с образованием прозрачного желтоватого раствора, который остается полностью прозрачным даже при хранении при температуре $+40^\circ\text{C}$ в течение 24 ч. При испытаниях на острую и хроническую токсичность и пирогенность введение животным (мыши, крысы, кролики) доз препарата, многократно (от 10 до 1000 раз) превышающих терапевтические дозы для человека, не вызывает токсической реакции, повышения температуры и других побочных эффектов. Антивирусная активность препарата проверяется на культуре фибробластов человека, зараженных вирусом везикулярного стоматита штамма "Индиана", составляет $5 \cdot 10^4$ МЕ/мл и практически не изменяется при хранении в течение 1 года при температуре $+4^\circ\text{C}$.

Пример 2. Сухой инъекционный препарат гамма-интерферона. Раствор состава (на одну дозу, мкг):

Высокоочищенный гамма-интерферон	20
Реополиглокин сухой	50000
Tween 20	500
Фосфатно-солевой буферный раствор рН 7,1	До 1 мл

готовят путем разбавления концентрированного раствора генно-инженерного гамма-интерферона стабилизирующим раствором на основе фосфатно-солевого буфера с указанными добавками, количество которых берут с учетом разбавления. Этот раствор высушивают способом, описанным в примере 1. Сухой препарат представляет собой таблетку белого цвета, быстро и без осадка растворяющуюся в воде для инъекций с образованием прозрачного бесцветного раствора, который остается прозрачным при комнатной температуре по крайней мере 7 сут. Активность препарата проверяют, как описано в примере 1, она составляет 200000 МЕ/дозу и существенно не снижается при хранении при температуре $+4^\circ\text{C}$ в течение 1 года.

Пример 3. Сухой инъекционный препарат гамма-интерферона.

Раствор состава (на одну дозу, мкг):

Высокоочищенный гамма-интерферон	50
Гистидина гидрохлорид	5000
Ацетатно-солевой буферный раствор рН 5,5	До 1 мл

получают аналогично препарату, описанному в примере 2, и высушивают способом, описанным в примере 1. Препарат растворяется в воде для инъекций в течение 5 - 10 с и остается прозрачным по крайней мере 3 сут. при температуре +30°C. Препарат не вызывает осложнений и побочных эффектов при испытаниях на лабораторных животных. Активность препарата, проверенная, как описано в примере 1, составляет 1 млн. МЕ/дозу. Хранение препарата при комнатной температуре (+20°C) в течение 6 мес. не приводит к снижению его антивирусной активности.

Как видно из примеров, добавление полимерных стабилизаторов улучшает сохраняемость жидкого и особенно сухого препарата, а добавление солюбилизирующих веществ - неионогенных ПАВ и солей аминокислот как поднимает первоначальный

уровень антивирусной активности, так и улучшает сохраняемость препарата.

Источники информации, принятые во внимание при экспертизе:

1. Алексеев К.В., Шалдырван Е.А. Лекарственные формы интерферона. Антибиотики и химиотерапия, т.35, № 9, 1990, с.51-54.

2. Патент EP N 0196203, опубл. 10.01.86, собственность Schering Corp., авторы Z.Yim, I.A.Chaudry.

3. J. of Interferon Research, special issue: Collected papers on endogenous Interferon deficiencies, May 1992.

4. Патент EP N 0163111, опубл. 03.10.90, собственность Kyowa Hakko Kogyo Co., авторы Y.Kato, E.Nayakawa, K.Fushya, A.Kondo.

5. Патент США N 4883661, опубл. 28.11.89.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Препарат генноинженерного гамма-интерферона, включающий интерферон и стабилизирующие добавки, отличающийся тем, что в качестве активного вещества содержит высокоочищенный гамма-интерферон с молекулярной массой 16,7 кДа, состоящий из 144 аминокислотных остатков, имеющий удельную антивирусную активность не менее $2 \cdot 10^7$ МЕ/мг и содержащий не менее 95% основного вещества в форме мономера, а в димерной форме не более 5%, а также дополнительно содержит биологически инертный полимерный наполнитель и аминокислоту либо ее соль и поверхностно-активное вещество (ПАВ) при следующем соотношении компонентов (в пересчете на одну дозу), мкг:

Высокоочищенный гамма-интерферон	10 - 100
Биологически инертный полимер с мол.м. 10 - 1000 тыс.Дальтон	$(5-70) \cdot 10^3$
Аминокислота либо ее соль	$(5 - 30) \cdot 10^3$
ПАВ	$(0,2 - 5) \cdot 10^3$

Солевая буферная система
pH 4,5 - 7,5

(8 - 12) ·
10⁴

2. Препарат по п.1, отличающийся тем, что в качестве биологически инертного полимера содержит поливинилпирролидон либо декстран (полиглюкин, реополиглюкин).

3. Препарат по п.1, отличающийся тем, что аминокислотой является аргинин, или гистидин, или лизин, или их физиологически приемлемые соли - ацетат, аспартат, глутамат, гидрохлорид, малеат.

4. Препарат по п.1, отличающийся тем, что в качестве ПАВ содержит Tween 20, или Tween 60, или Tween 80, или Span 20, или Span 40, или Span 60, или любое другое, аналогичное им по физико-химическим и биологическим свойствам.

5. Препарат по п.1, отличающийся тем, что в качестве буферной солевой системы содержит ацетатно-солевой, фосфатно-солевой или цитратно-солевой буферы или инъекционный жидкий раствор "Гемодез".

Заказ 147

Подписное

ВНИИПИ, Рег. ЛР № 040720
113834, ГСП, Москва, Раушская наб., 4/5

121873, Москва, Бережковская наб., 24 стр. 2.
Производственное предприятие «Патент»